

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005787

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-096744
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 6 7 4 4

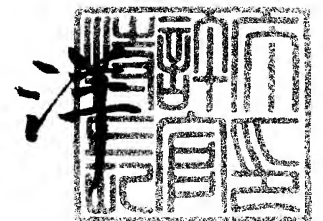
パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 0 9 6 7 4 4
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 杉 山 治 夫

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	C1-A0403
【提出日】	平成16年 3月29日
【あて先】	特許庁長官 殿
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府箕面市船場西2-19-30
【氏名】	杉山 治夫
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府箕面市小野原東5-18-14-202
【氏名】	保仙 直毅
【発明者】	
【住所又は居所】	イギリス エジンバラ ウェスタン ジェネラル ホスピタル エムアールシー ヒューマン ジェネティクス ユニット
【氏名】	ハスティー エヌディー
【特許出願人】	
【住所又は居所】	大阪府箕面市船場西2-19-30
【氏名又は名称】	杉山 治夫
【代理人】	
【識別番号】	100102978
【弁理士】	
【氏名又は名称】	清水 初志
【選任した代理人】	
【識別番号】	100108774
【弁理士】	
【氏名又は名称】	橋本 一恵
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	041092
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

細胞集団の中から肝細胞、内皮細胞、または造血細胞の前駆細胞を分離する方法であって、

(a) 該細胞集団における細胞のWT1遺伝子の発現を検出する工程、および

(b) WT1遺伝子の発現が検出された細胞を分離する工程、

を含む方法。

【請求項 2】

細胞集団の中から肝細胞、内皮細胞、および造血細胞の前駆細胞のうち少なくとも2つの前駆細胞を同時に分離する方法であって、

(a) 肝細胞、内皮細胞、および造血細胞の前駆細胞のうち少なくとも2つの前駆細胞を含む細胞集団における細胞のWT1遺伝子の発現を検出する工程、および

(b) WT1遺伝子の発現が検出された細胞を分離する工程、

を含む方法。

【請求項 3】

WT1遺伝子の発現をWT1遺伝子またはそのプロモーターに結合されたレポーター遺伝子の発現を指標に検出する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

レポーター遺伝子がlacZ遺伝子またはGFP遺伝子であり、レポーター遺伝子の発現をFACSアッセイにより検出する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

$2.21 (\pm 1.62) \times 10^{-2}$ の範囲内のWT1遺伝子の発現レベル（白血病細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合）で肝細胞前駆細胞または内皮前駆細胞を、 $3.54 (\pm 3.39) \times 10^{-4}$ の範囲内のWT1遺伝子の発現レベル（白血病細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合）で造血前駆細胞を分離する、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞集団の中から肝細胞、内皮細胞、または造血細胞の前駆細胞を分離する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞集団の中から前駆細胞を分離する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

動物の体内にはさまざまな種類の幹細胞および前駆細胞がある。いずれの種類の組織にも組織特異的な幹細胞および前駆細胞が存在し、組織の維持のために多くの娘細胞を生成する。

【0003】

これまでに多くの研究者が多大な努力を払って複数の種類の組織特異的な幹細胞および前駆細胞を単離しており、これには2種類の異なる戦略が用いられている。その1つは、造血幹細胞または前駆細胞の単離を目的とする細胞表面抗原（例えば、c-kit⁺、Thy.1^{lo}、Sca-1⁺およびlin⁻）の組み合わせに基づく細胞分離であった（非特許文献1）。もう1つは、レポーター遺伝子を用いた特定の遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）を幹細胞または前駆細胞に特異的な遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーと融合させたもの、例えば、神経幹細胞の単離のためのネスチンエンハンサー-GFPレポーター（非特許文献2）など）の発現により、細胞を標識することであった。

【0004】

この2つの戦略のいずれにおいても、マーカー分子の多くは1つの系譜の幹細胞または前駆細胞に対して特異的である。系譜にかかわらず共通する分子マーカーは、これまでに報告がない。

【非特許文献1】 Morrison S. J., et al. The biology of hematopoietic stem cells. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1995; 11: 35-71

【非特許文献2】 Roy NS, et al. In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. Nat Med. 2000; 6: 271-7.

【非特許文献3】 Call KM, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell. 1990; 60: 509-520

【非特許文献4】 Gessler M, et al. Homozygous deletion in Wilms tumors of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. Nature. 1990; 343: 774-778

【非特許文献5】 Menke, A.L., et al. The Wilms' tumor 1 gene: Oncogene or tumor suppressor gene? Int Rev Cytol. 1998; 181: 51-212.

【非特許文献6】 Larsson SH, et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. Cell. 1995; 81: 391-401.

【非特許文献7】 Kreidberg, J.A., et al. WT-1 is required for early kidney development. Cell. 1993; 74: 679-691.

【非特許文献8】 Inoue, K., et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood. 1994; 84: 3071-3079.

【非特許文献9】 Sugiyama, H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. Int. J Hematol. 2002; 73: 177-87.

【非特許文献10】 Menssen HD, et al. Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. Int J Hematol. 2002; 76: 103-9.

【非特許文献11】 Loeb DM, et al. The role of WT1 in oncogenesis: tumor suppressor or oncogene? Int J Hematol. 2002; 76: 117-26.

【非特許文献12】 Oji Y, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1

in primary thyroid cancer. 2003; 94: 606-611.

【非特許文献13】 Oji Y, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. Cancer Sci. 2003; 94: 712-7.

【非特許文献14】 Oji Y, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2003; 94: 523-9.

【非特許文献15】 Inoue K, et al. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. Blood. 1997; 89: 1405-1412

【非特許文献16】 Hosen N, et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. Br J Haematol. 2002; 116: 409-20.

【非特許文献17】 Moore AW, et al. YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. Mech Dev. 1998; 79: 169-84

【非特許文献18】 Fiering SN et al. Improved FACS-Gal: flow cytometric analysis and sorting of viable eukaryotic cells expressing reporter gene constructs. Cytometry. 1991; 12: 291-301.

【非特許文献19】 Li H, et al. The lck promoter-driven expression of the Wilms tumor gene WT1 blocks intrathymic differentiation of T-lineage cells. Int J Hematol. 2003; 77: 463-70.

【非特許文献20】 Suzuki A, et al. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. Hepatology. 2000; 32: 230-9.

【非特許文献21】 Asahara T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997; 275: 964-7.

【非特許文献22】 Murayama A, et al. Flow cytometric analysis of neural stem cells in the developing and adult mouse brain. J Neurosci Res. 2002; 69: 837-47.

【非特許文献23】 Arai F, et al. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. J Exp Med. 2002; 195: 1549-63.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、細胞の系譜にかかわらず種々の前駆細胞に共通する分子マーカーを提供することにある。さらなる本発明の目的は、この種々の前駆細胞に共通する分子マーカーを利用して、細胞集団の中から前駆細胞を分離する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

ウィルムス腫瘍遺伝子WT1は、小児腎癌の一つであるウィルムス腫瘍の原因遺伝子として同定された（非特許文献3,4）。WT1遺伝子はジンクフィンガーモチーフを有する転写因子をコードし、成長、分化およびアポトーシスに関連する多くの遺伝子の発現を調節する（非特許文献5）。WT1遺伝子はmRNAスプライシングにも重要な役割を果たす（非特許文献6）。WT1遺伝子を破壊したマウスの分析により、WT1遺伝子が泌尿生殖器の初期発生に決定的な役割を果たすことが示されている（非特許文献7）。本発明者ら（非特許文献8,9）および他の研究者ら（非特許文献10）は、ほぼすべての白血病試料で疾患のサブタイプとは無関係に野生型WT1遺伝子が高発現されることを以前に報告している。また、WT1は、肺癌（非特許文献11）、乳癌（非特許文献11）、甲状腺癌（非特許文献12）および結腸癌（非特許文献13）、頭頸部扁平上皮癌（非特許文献14）、腎細胞癌（非特許文献11）、悪性中皮腫（非特許文献11）などの多くの種類の固形腫瘍でも過剰発現される。これに対して

、WT1遺伝子は多くの種類の正常組織において極めて低レベルで発現される（非特許文献12-16）。正常ヒト造血細胞ではWT1は低レベルで発現され、その発現は未熟CD34+前駆細胞に局限される（非特許文献15）。最近、本発明者らは、正常造血細胞に存在する「WT1を発現する前駆細胞」の頻度は極めて低い（CD34+細胞の1.2%に過ぎない）ことを明らかにした（非特許文献16）。本発明者らはこれらの結果に基づき、「WT1を発現する前駆細胞」が多くの種類の組織にも極めて低い頻度で存在する可能性があると考えた。

【0007】

胎仔肝臓は、肝細胞、内皮細胞、造血細胞などのさまざまな細胞系譜の前駆細胞を含む。したがって、胎仔肝臓は上記仮説を検証するための理想的な臓器である。本発明者らは、WT1発現性の胎仔肝細胞の同定および回収を行うこと、ならびに肝細胞、内皮細胞および造血細胞の前駆細胞がWT1発現細胞に多く存在するか否かを検証することを試みた。その結果、マウス胎仔肝細胞を、WT1遺伝子の発現レベルによって3つの異なる部分集団に明確に分離しうることを、内皮前駆細胞がWT1++胎仔肝細胞に多く含まれること、造血前駆細胞はWT1発現レベルが中程度の細胞に多く存在することが判明した。さらに本発明者らは、WT1発現細胞が胎仔脳および胎仔肢などの他の胎仔組織に存在するか否かについても検討した。すると、高レベルのWT1を発現する細胞が胎仔脳細胞および間葉細胞にも低頻度で存在することが判明した。

【0008】

すなわち、本発明者らは生きたWT1発現細胞のFACSソーティングに成功するとともに、マウス胎仔肝細胞におけるWT1発現が肝細胞、内皮細胞および造血細胞の前駆細胞に共通する分子マーカーであることを初めて示し、本発明を完成するに至った。

【0009】

本発明は、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

[1] 細胞集団の中から肝細胞、内皮細胞、または造血細胞の前駆細胞を分離する方法であって、

（a）該細胞集団における細胞のWT1遺伝子の発現を検出する工程、および

（b）WT1遺伝子の発現が検出された細胞を分離する工程、

を含む方法

[2] 細胞集団の中から肝細胞、内皮細胞、および造血細胞の前駆細胞のうち少なくとも2つの前駆細胞を同時に分離する方法であって、

（a）肝細胞、内皮細胞、および造血細胞の前駆細胞のうち少なくとも2つの前駆細胞を含む細胞集団における細胞のWT1遺伝子の発現を検出する工程、および

（b）WT1遺伝子の発現が検出された細胞を分離する工程、

を含む方法

[3] WT1遺伝子の発現をWT1遺伝子またはそのプロモーターに結合されたレポーター遺伝子の発現を指標に検出する、[1]または[2]に記載の方法

[4] レポーター遺伝子がlacZ遺伝子またはGFP遺伝子であり、レポーター遺伝子の発現をFACSアッセイにより検出する、[3]に記載の方法

[5] $2.21 (\pm 1.62) \times 10^{-2}$ の範囲内のWT1遺伝子の発現レベル（白血病細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合）で肝細胞前駆細胞または内皮前駆細胞を、 $3.54 (\pm 3.39) \times 10^{-4}$ の範囲内のWT1遺伝子の発現レベル（白血病細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合）で造血前駆細胞を分離する、[1]から[4]のいずれかに記載の方法

【発明の効果】

【0010】

本発明の分子マーカーにより、前駆細胞の存在が確認されていなかった組織から前駆細胞を容易に同定または回収することが可能になる。特に本発明の分子マーカーは、肝細胞の前駆細胞、内皮細胞の前駆細胞、造血細胞の前駆細胞など、種々の系譜の前駆細胞に共通するマーカーであるため、前駆細胞の同定および回収において汎用性が高いという利点を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明は、WT1遺伝子の発現を指標に細胞集団の中から前駆細胞を分離する方法を提供する。

【0012】

本発明において「WT1遺伝子」とは、ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として同定された、ジंकフィンガーモチーフを有する転写因子をコードする遺伝子を意味する。「WT1遺伝子」は、その由来を問わず、ヒト、マウス、その他の脊椎動物由来のWT1遺伝子が含まれる。

【0013】

本発明の方法において分離する前駆細胞としては、WT1遺伝子を発現しうるものであれば制限はないが、例えば、肝細胞、内皮細胞、または造血細胞の前駆細胞が標的として好ましい。前駆細胞の分離は、(a) 前駆細胞を分離する対象となる細胞集団における細胞のWT1遺伝子の発現を検出する工程、および(b) WT1遺伝子の発現が検出された細胞を分離する工程、を含む。

【0014】

WT1遺伝子は、本発明者により、肝細胞、内皮細胞、および造血細胞の前駆細胞の共通マーカーとなることが見出された。従って、WT1遺伝子の発現を指標にすれば、肝細胞、内皮細胞、および造血細胞の前駆細胞のうち少なくとも2つの前駆細胞を含む細胞集団の中から肝細胞、内皮細胞、および造血細胞のうち少なくとも2つの前駆細胞を同時に分離することができる。

【0015】

細胞におけるWT1遺伝子の発現の検出のための方法は、細胞を生きたまま検出する方法であれば特に制限はない。好ましくは、WT1遺伝子またはそのプロモーターに結合されたレポーター遺伝子の発現を指標に検出する方法である。レポーター遺伝子としては、その発現を検出しうるものであれば特に制限はない。例えば、レポーター遺伝子としてlacZ遺伝子やGFP遺伝子を用いれば、FACSアッセイによりレポーター遺伝子の発現を簡便に検出し、分離することができる。

【0016】

GFP遺伝子をレポーター遺伝子として利用する場合には、例えば、WT1遺伝子プロモーターの下流にGFP遺伝子が機能的に(GFP遺伝子が宿主細胞内で発現するように)結合されたベクターが導入されたトランスジェニック動物を作成し、該動物から採取した細胞につきGFP遺伝子の発現を指標に、目的の細胞を検出することができる。また、WT1遺伝子プロモーター領域より下流にGFP遺伝子をノックインした動物を作成し、該動物から採取した細胞につきGFP遺伝子の発現を指標に、目的の細胞を検出することができる。

【0017】

本発明の方法により、肝細胞前駆細胞または内皮前駆細胞を分離する場合には、 $2.21 (\pm 1.62) \times 10^{-2}$ の範囲内のWT1遺伝子の発現レベル(白血病細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合)を指標に行なえばよく、また、造血前駆細胞を分離する場合には、 $3.54 (\pm 3.39) \times 10^{-4}$ の範囲内のWT1遺伝子の発現レベル(白血病細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合)を指標に行なえばよい。これにより目的の前駆細胞を効率的に分離することが可能となる。

【0018】

分離された前駆細胞は、特に再生医療分野において広く用いることが可能である。

【実施例】

【0019】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0020】

【実施例1】

生きたWT1発現細胞を単離し、それらに対して形態的および機能的な評価を行うことを試みた。この目的のため、WT470LZトランスジェニック (WT470LZ Tg) マウスを使用した (非特許文献17)。このWT470LZトランスジェニックマウスは、WT1座位の全長に及ぶ470kbの酵母人工染色体 (YAC) が導入されたマウスである。WT1の発現を追跡するため、lacZレポーター遺伝子を酵母内での相同組換えによりYAC中のWT1遺伝子のエクソン1に導入した。その結果得られたYACベクターを前核にマイクロインジェクションし、WT470LZ Tgマウスを作製した。lacZ遺伝子の発現パターンは、文献に記載されたとおり (非特許文献17)、WT1遺伝子の既知の発現部位を反映した。

【0021】

上記トランスジェニックマウスの生きたWT1発現細胞を、文献 (非特許文献18) と同様に、FACS-Gal法によって同定し、回収した。WT470LZ Tgおよび野生型同腹仔マウスのE12.5時点の胚の胎仔肝細胞を、フルオレセイン・ジ- β -D-ガラクトシド (FDG; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) で標識した後 (非特許文献18)、FACS Vantage SE (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) によりセルソーティングを行った。死細胞はPI (ヨウ化プロピジウム) 取り込みに基づく分析から除外した (図1A上)。生細胞 (PI⁻細胞) を β -ガラクトシダーゼ活性に従って3つの部分集団に分離した (図1A)。WT470LZ Tgマウス由来の胎仔肝細胞は、 β -ガラクトシダーゼ活性のレベルが高いもの (lacZ⁺⁺; $1.0 \pm 0.1\%$)、中程度のもの (lacZ⁺; $11.6 \pm 1.2\%$)、および低いか認められないもの (lacZ⁻; $87.4 \pm 1.2\%$) に分類された。lacZ⁺細胞は中程度にWT1を発現する細胞と内因性 β -ガラクトシダーゼ活性を有する細胞との混合物であった。WT1+細胞の頻度は、野生型同腹仔におけるlacZ⁺細胞の頻度をWT470LZ Tgマウスにおける頻度から差し引くことによって算出した。lacZ⁺細胞集団に含まれるWT1+細胞の頻度は $3.2 \pm 0.5\%$ であった (表1)。表1は、胎仔肝臓、胎仔肢および胎仔脳におけるlacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞の頻度を示す。LMは同腹仔を表す。同腹仔におけるlacZ⁺細胞およびlacZ⁺⁺細胞の頻度をWT470LZ Tgマウスにおける値から差し引き、Tg-LM系統の項に示している。Tg-LM系統の項に示されたlacZ⁻細胞の頻度は、Tg-LM系統におけるlacZ⁺細胞およびlacZ⁺⁺細胞の合計を100%から差し引くことによって算出した。各値は平均 \pm SEとして示されている。

【0022】

【表 1】

Cells	mouse	lacZ ⁻	lacZ ⁺	lacZ ⁺⁺
Fetal liver	WT470LZ Tg	87.4 ± 1.2%	11.6 ± 1.2%	1.0 ± 0.1%
(n=15)	Littermates	91.6 ± 1.1%	8.4 ± 0.9%	0.03 ± 0%
	Tg-LM	95.8 ± 0.5%	3.2 ± 0.5%	1.0 ± 0.1%
Fetal brain	WT470LZ Tg	82.2 ± 5.3%	17.1 ± 5.1%	0.7 ± 0.1 %
(n=4)	Littermates	92.5 ± 2.2%	7.5 ± 2.0%	0.03 ± 0%
	Tg-LM	89.7 ± 4.3%	9.6 ± 4.2%	0.7 ± 0%
Fetal limb	WT470LZ Tg	68.8 ± 2.5%	31.0 ± 2.5%	0.2 ± 0.1 %
(n=3)	Littermates	82.6 ± 1.8%	17.3 ± 2.3%	0.03 ± 0 %
	Tg-LM	86.1 ± 1.2%	13.7 ± 0.9%	0.2 ± 0.1 %

【0023】

β -ガラクトシダーゼ活性がWT1発現レベルと厳密に相関するか否かについて検討した。文献（非特許文献19）と同様に、lacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞のFACSソーティングを行い、各集団におけるWT1発現レベルをリアルタイムRT-PCRによって測定した。結果を図1Bに示す。白血球細胞株K562でのWT1遺伝子の発現レベルを1とした場合におけるlacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞におけるWT1 mRNAの発現レベルはそれぞれ $2.21 (\pm 1.62) \times 10^{-2}$ 、 $3.54 (\pm 3.39) \times 10^{-4}$ 、 $1.94 (\pm 1.73) \times 10^{-4}$ であった（n=4）。lacZ⁺細胞の約3分の2はWT1発現を伴わない細胞と考えられたため、lacZ⁺細胞集団に存在する純粋なWT1発現細胞のWT1発現レベルは、lacZ⁺細胞集団として得られた発現レベルの約3倍に相当すると考えられた。これらの結果から、lacZ⁺細胞は非特異的 β -ガラクトシダーゼ活性を有する細胞を多く含んでいるものの、lacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞が、それぞれ、WT1 mRNA発現レベルが高い細胞（WT1⁺⁺）、中程度の細胞（WT1⁺）および低いまたは認められない細胞（WT1⁻）に対応することが示された。

【0024】

FACSソーティングを行った胎仔肝lacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞を細胞遠心処理にかけ、May-Grunwald-Giemsa染色を行った。lacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞の形態的特徴は著しく異なっていた（図1C）。lacZ⁺⁺細胞の大部分は幅広い好塩基性の細胞質ならびに微細なクロマチン構造を伴う核を有することから、未熟細胞であることが示唆された。しかし、それらは造血幹細胞とも前駆細胞とも異なっていた。lacZ⁺細胞には非特異的 β -ガラクトシダーゼ活性を有する細胞があり、部分的に不均一であった。lacZ⁺細胞の約3分の1は、細胞質が狭小で微細なクロマチン構造を伴う核を有する細胞であり、このことはそれらが原始造血前駆細胞であることを示唆する。残りのlacZ⁺細胞のほとんどは、さまざまな成熟度の赤芽球であった。lacZ⁻細胞のほとんどは成熟赤芽球であった。これらの結果から、マウス胎仔肝細胞を、WT1遺伝子の発現レベルによって3つの異なる部分集団に明確に分離しうることが明らかに示された。

【0025】

【実施例2】

肝細胞前駆細胞がWT1を発現する胎仔肝細胞に多く含まれるか否かについて検討した。WT470LZ TgマウスからのlacZ⁺⁺、lacZ⁺およびlacZ⁻胎仔肝細胞をFACSソーティングにかけ、文献の報告に従って培養下肝細胞コロニー形成単位（H-CFU-C）アッセイを行った（非特許文献20）。lacZ⁺⁺、lacZ⁺、lacZ⁻胎仔肝細胞は、細胞 5.0×10^3 個当たりそれぞれ 52.7 ± 6.1 、 0.33 ± 0.33 および0個のH-CFU-Cコロニーを生じた（ $n=3$ ）（図2A）。これらのコロニーは抗アルブミン抗体（Intercell technologies Inc., Hopewell, NJ）により陽性染色され、それらがH-CFU-Cコロニーであることが示された（図2B、C）。これらの結果から、肝細胞前駆細胞がWT1⁺胎仔肝細胞に多く含まれることが明らかに示された。

【0026】

【実施例3】

lacZ⁺⁺、lacZ⁺およびlacZ⁻胎仔肝細胞に存在する内皮前駆細胞（EPC）の頻度に関して、検討した。文献（非特許文献21）にしたがって、EPC培養系を用いて分析した。

【0027】

FACSソーティングを行った胎仔肝細胞を、フィブロネクチンをコーティングした35mm培養皿に1枚当たり細胞 1.5×10^4 個の密度でプレーティングした。WT470LZ Tgマウス由来のlacZ⁺⁺、lacZ⁺およびlacZ⁻胎仔肝細胞は、 1mm^2 当たりそれぞれ 43.7 ± 14.5 、 9.7 ± 2.3 および 1.3 ± 1.1 個の付着細胞を生じた（ $n=4$ ）（図2D）。Dil標識アセチル化低密度リボタンパク質（acLDL-Dil）（Sigma-Aldrich, St. Louis, MI）の取り込みが4時間の共培養後に付着細胞内に検出され、これらの細胞が内皮細胞であることが示された（図2E、F）。これらの結果から、内皮前駆細胞がWT1⁺⁺胎仔肝細胞に多く含まれることが明らかに示された。

【0028】

【実施例4】

lacZ⁺⁺、lacZ⁺およびlacZ⁻胎仔肝細胞における造血前駆細胞の頻度についても分析した。WT470LZ Tgマウス由来のlacZ⁺⁺、lacZ⁺およびlacZ⁻胎仔肝細胞を、15%ウシ胎仔血清、50ng/ml マウスSCF、10ng/ml マウスIL-3、10ng/ml ヒトIL-6および3単位/ml ヒトEpoを添加したメチルセルロース培地（Methocult3434、Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Canada）中で培養した。lacZ⁺⁺細胞、lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞は、平均 1.5×10^4 個当たり、それぞれ 0.5 ± 0.3 、 3.7 ± 0.7 および 0.3 ± 0.3 顆粒球、赤芽球、マクロファージ、巨核球コロニー形成単位（CFU-GEMM）のコロニー、 5.8 ± 2.4 、 43.7 ± 8.2 および 9.3 ± 4.9 顆粒球/マクロファージコロニー形成単位（CFU-GM）のコロニー、ならびに 0.8 ± 0.8 、 4.2 ± 2.1 および 2.8 ± 1.4 赤芽球バースト形成単位（BFU-E）のコロニーを形成した（ $n=4$ 、図2G）。これらの結果から、CFU-GEMM、CFU-GMおよびBFU-EはlacZ⁺胎仔肝細胞に多く含まれることが示された。

【0029】

lacZ⁺部分集団は、図1Aに示した通り、非特異的p-ガラクトシダーゼ活性を有する細胞を多く含んでいた。このため、造血前駆細胞が内因性β-ガラクトシダーゼ活性を有する細胞に多く存在する可能性を否定するために、野生型マウス由来のlacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞の造血コロニー形成能を分析した。lacZ⁺細胞およびlacZ⁻細胞はそれぞれ、0および 3.0 ± 1.1 CFU-GEMM、 18.0 ± 5.6 および 16.5 ± 4.6 CFU-GM、ならびに 4.2 ± 1.1 および 6.3 ± 1.1 BFU-Eのコロニーを形成した（ $n=3$ ）。これらの結果から、造血前駆細胞は内因性β-ガラクトシダーゼ活性を有する細胞には多くなく、WT1発現レベルが中程度の細胞に多く存在することが示された。

【実施例5】

【0030】

「WT1を発現する前駆細胞」が脳組織または間葉組織などの他の胎仔組織にも存在するか否かを検討した。胎仔脳および胎仔肢由来の細胞懸濁液を文献（非特許文献22、23）に記載の通りに調製し、FACS-Galアッセイによって分析した。

【0031】

WT470LZ Tgマウスの胎仔脳におけるlacZ++細胞は、 $0.7 \pm 0.1\%$ であった（図3A、表1）。WT1+細胞の頻度は、野生型マウスにおけるlacZ+細胞の頻度をWT470LZ Tgマウスにおける頻度から差し引くことによって算出した。WT1+細胞の頻度は、 $9.6 \pm 4.2\%$ であった（図3A、表1）。WT470LZ Tgマウスの胎仔肢におけるlacZ++細胞の頻度は、 $0.21 \pm 0.07\%$ であった（図3B、表1）。WT1+細胞の頻度は $13.7 \pm 0.9\%$ であった（表1）。これらの結果から、「高レベルのWT1を発現する細胞」が胎仔脳細胞および間葉細胞にも低頻度で存在することが示された。胎仔脳および胎仔肢ともに、WT1発現レベルが中程度の細胞の方が多かった。

【図面の簡単な説明】

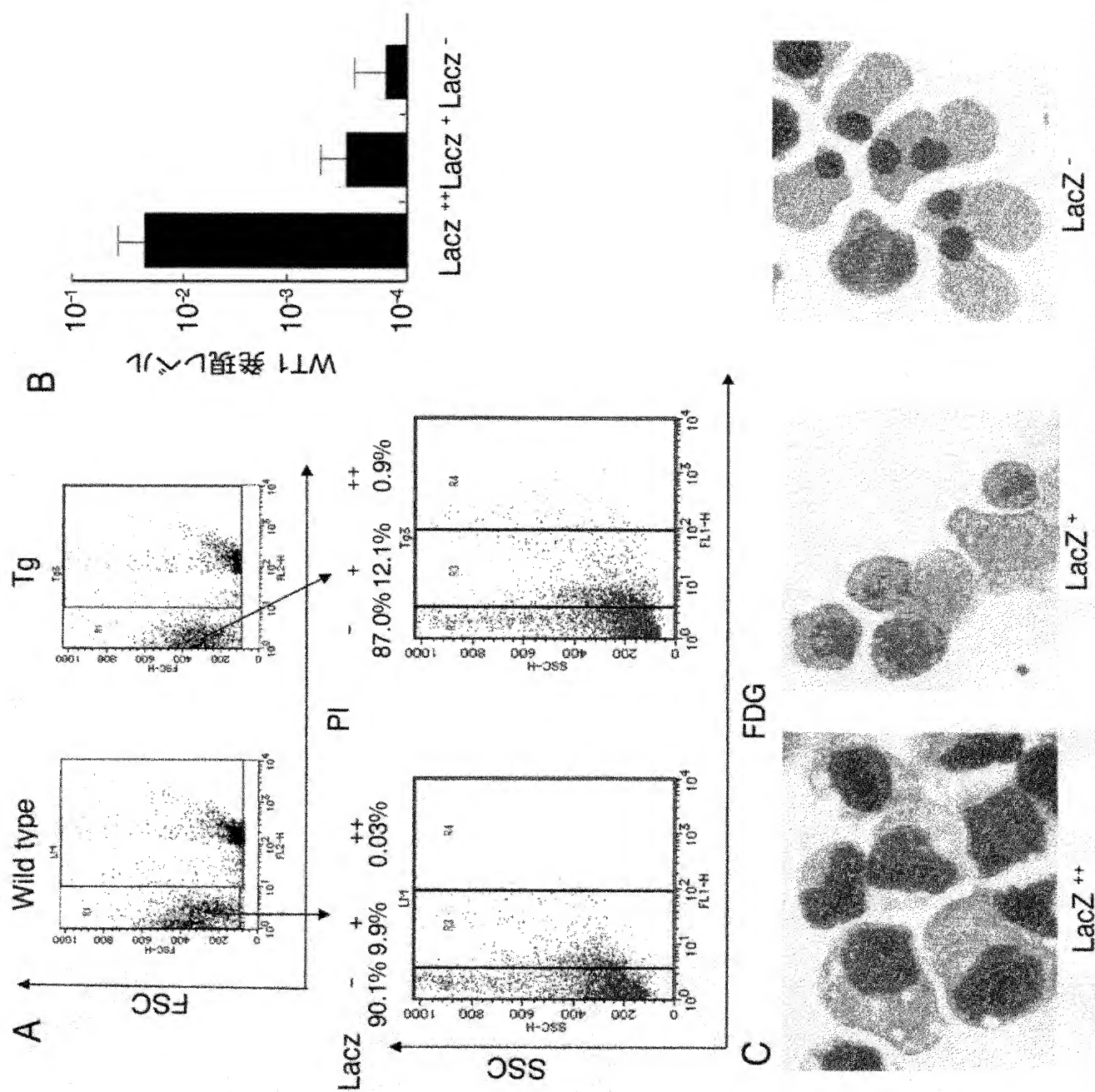
【0032】

【図1】マウス胎仔肝細胞がWT1遺伝子の発現レベルによって3つの異なる部分集団に分離することができたことを示す図（A、B）および写真（C）である。A. WT470LZ Tgおよび野生型マウスのE12.5時点の胚の胎仔肝細胞をFDGとともにインキュベートした際の代表的なFACSプロファイル。上図には前方散乱に対するヨウ化プロピジウム（PI）染色のFACSプロファイルを示している。死細胞はPI取り込みに基づく分析から除外した。下図において、X軸はFACS-Galで標識した胎仔肝細胞に関する β -ガラクトシダーゼ活性（蛍光として測定）を表している。Y軸は側方散乱を表す。区分枠（gating window）および各枠内の比率はlacZ++、lacZ+およびlacZ-画分について示している。生細胞の合計（PI-）に占める各集団の比率を示した。B. 別に記載された通りに（非特許文献19）、3000個のlacZ++細胞、lacZ+細胞またはlacZ-細胞をFACSソーティングにかけ、定量的リアルタイムRT-PCRによりWT1発現レベルに関して分析した。各値は3回の独立した実験による平均±標準誤差（SE）を表す。C. lacZ++細胞、lacZ+細胞およびlacZ-細胞の形態的特徴。lacZ++細胞、lacZ+細胞およびlacZ-細胞をWT470LZ Tgマウスの胎仔肝細胞からFACSソーティングにかけた。ソーティングされた細胞の細胞遠心標本にMay-Grunwald-Giemsa染色を行ったものを示している。

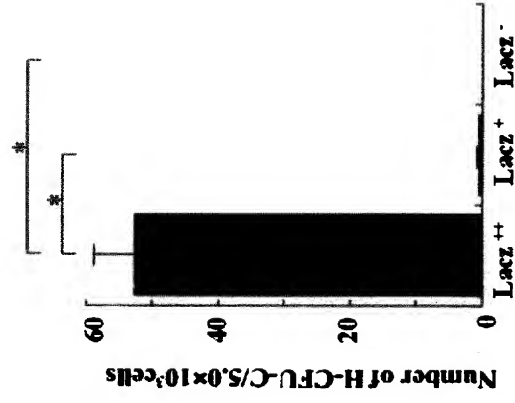
【図2】肝細胞（A、B、C）、内皮細胞（D、E、F）および造血細胞（G）の前駆細胞は、WT1を発現する胎仔肝細胞に多く含まれていたことを示す図（A、D、G）および写真（B、C、E、F）である。A. lacZ++細胞、lacZ+細胞およびlacZ-細胞から生じた細胞5000個当たりのH-CFU-Cコロニー数を示している。各値は3回の独立した実験による平均±標準誤差（SE）を表す。B. lacZ++細胞に由来する代表的なH-CFU-Cコロニーを示している。C. これらのコロニーは抗アルブミン抗体により陽性染色された。D. FACSソーティングを行った胎仔肝細胞をフィブロネクチンをコーティングした35mm培養皿に1枚当たり 1.5×10^4 個の密度でプレーティングした。lacZ++、lacZ+およびlacZ-胎仔肝細胞から4日間のEPC培養後に生じた1mm²当たりの付着細胞数を示している。各値は3回の独立した実験による平均±SEを表す。E. EPC培地中のフィブロネクチン上にlacZ+胎仔肝細胞をプレーティングして4日後の付着細胞。F. acLDL-Dilと4時間共培養した後に、付着細胞におけるacLDL-Dilの取り込みが観察された。G. WT470LZ Tgおよび野生型マウス由来のソーティングされたlacZ++、lacZ+、lacZ-胎仔肝細胞のメチルセルロース寒天培養物における第12日のCFU-GEMM、第9日のCFU-GMおよびBFU-Eの頻度を示している。各値は3回の独立した実験による平均±SEを表す。

【図3】「WT1発現細胞」が（A）胎仔脳および（B）胎仔肢に極めて低い頻度で存在したことを示す図である。細胞懸濁液は以前に報告された通りに調製した（非特許文献22、23）。上図にはPI染色を前方散乱に対してプロットしたFACSプロファイルを示している。死細胞はPI取り込みに基づく分析から除外した。下図において、X軸はFACS-Galで標識した胎仔肝細胞に関する β -ガラクトシダーゼ活性（蛍光として測定）を表している。Y軸は側方散乱を表す。細胞は胎仔肝細胞と同じように β -ガラクトシダーゼ活性に従って3つの部分集団に分離された。区分枠および各枠内の比率をlacZ++、lacZ+およびlacZ-画分について示している。生細胞の合計（PI-）に占める各集団の比率を示した。A. WT470LZ Tgおよび野生型マウスのE14.5時点の胚の胎仔脳細

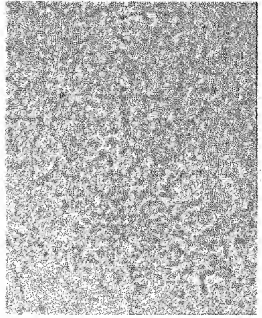
胞をFDGとともにインキュベートした際の代表的なFACSプロフィール。B. WT470LZ Tg
および野生型マウスのE16.5時点の胚の胎仔肢細胞をFDGとともにインキュベートした
際の代表的なFACSプロフィール。



A

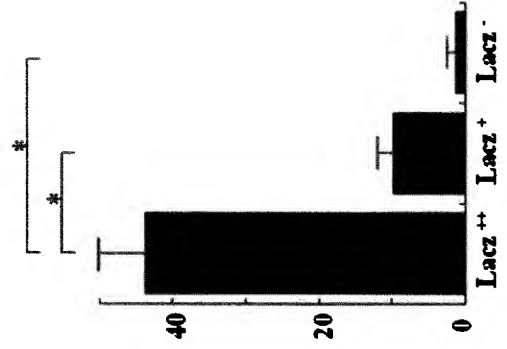


B

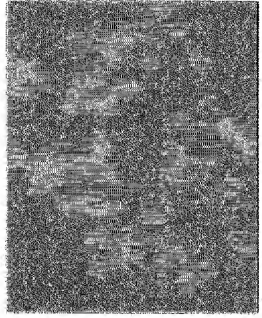


D

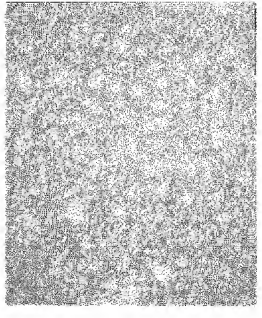
Number of attaching cells (per mm²)



C

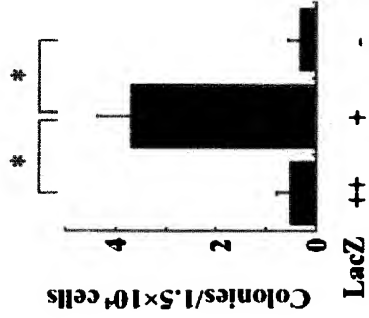


F

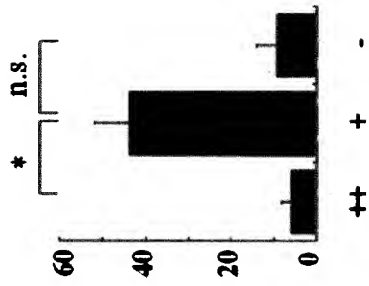


G

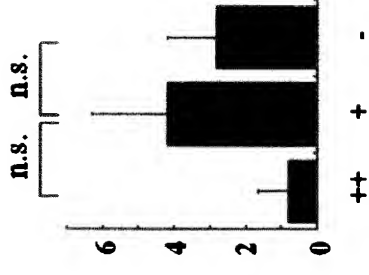
CFU-GEMM



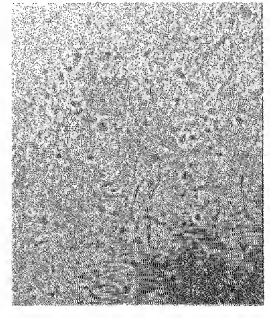
CFU-GM

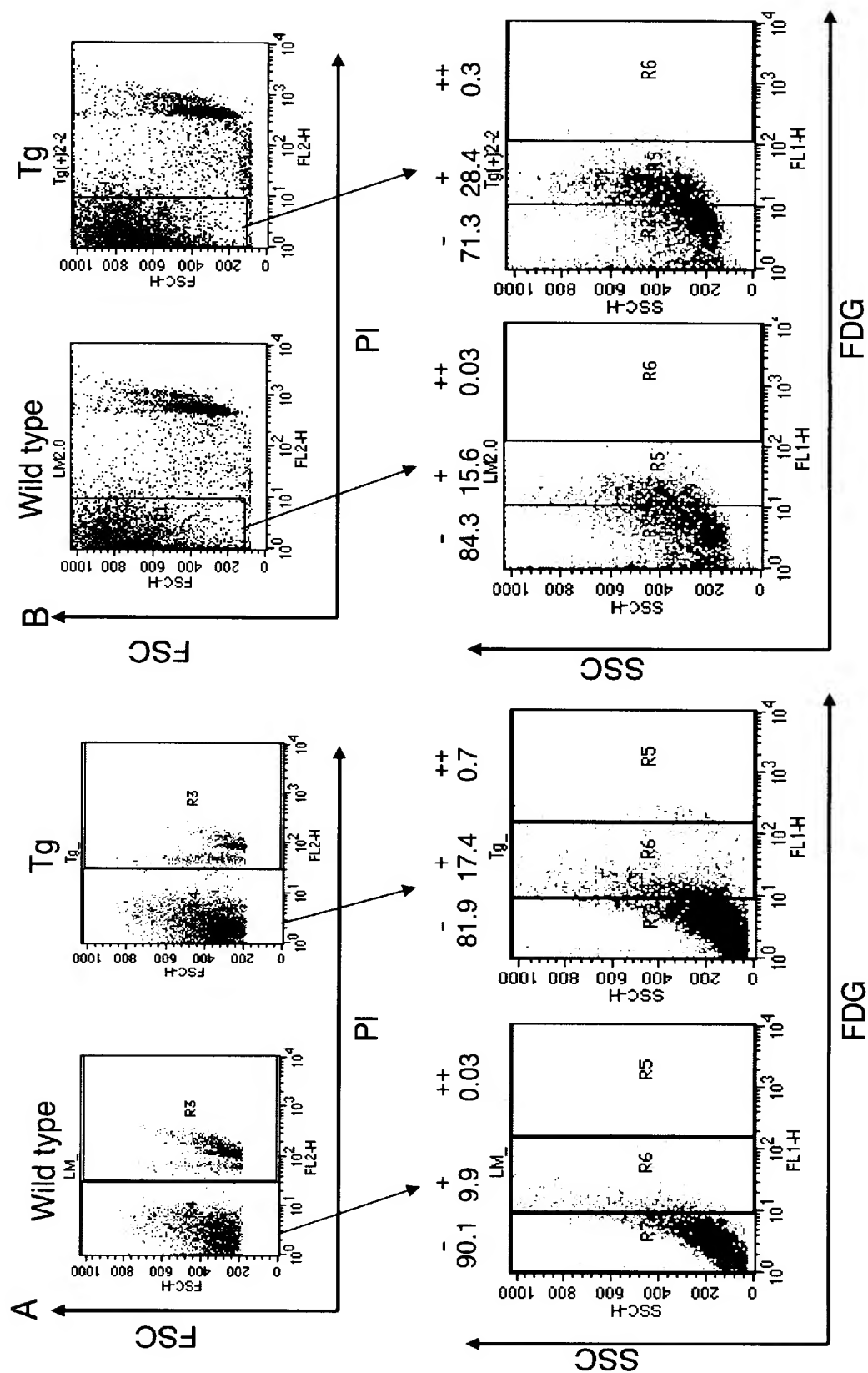


BFU-E



E





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の目的は、細胞の系譜にかかわらず種々の前駆細胞に共通する分子マーカーを提供し、さらに、この分子マーカーを利用して、細胞集団の中から前駆細胞を分離する方法を提供することにある。

【解決手段】 生きたWT1発現細胞のFACSソーティングに成功するとともに、マウス胎仔肝細胞におけるWT1発現が肝細胞、内皮細胞および造血細胞の前駆細胞に共通する分子マーカーであることを見出した。

【選択図】 なし

出願人履歴

5 9 5 0 9 0 3 9 2

19950601

新規登録

大阪府箕面市船場西 2 - 1 9 - 3 0

杉山 治夫